

## Характеристика штаммов микроорганизмов, устойчивых к присутствию в среде белого фосфора

DOI: 10.18522/2308-9709-2020-33-1

Антон Зуфарович Миндубаев<sup>a\*</sup>, Керемли Ашырмухаммедович Сапармырадов<sup>c</sup>, Йав Абайе Акосах<sup>c</sup>, Эдуард Викторович Бабынин<sup>c</sup>, Салима Тахиятулловна Минзанова<sup>b</sup>, Александра Дмитриевна Волошина<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Институт энергетики и перспективных технологий ФИЦ Казанского научного центра РАН

<sup>b</sup> Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ КазНЦ РАН.

<sup>c</sup> ГАОУ ВПО Казанский (Приволжский) федеральный университет.

E-mail: [mindubaev-az@yandex.ru](mailto:mindubaev-az@yandex.ru)

**Аннотация.** Белый фосфор является одним из самых опасных загрязнителей окружающей среды. В наших работах впервые получены культуры микроорганизмов, растущих в средах с содержанием белого фосфора до 1 %. Открытые культуры уникальны, и демонстрируют первый в мире наблюдавшийся пример включения белого фосфора в биосферный круговорот химического элемента фосфора.

Выполнены морфологическое, отчасти биохимическое и таксономическое описания культур микроорганизмов, осуществляющих биодegradацию белого фосфора. Эта работа имеет важное значение, поскольку уникальный набор признаков является характеристикой штамма. Сам факт существования нового штамма микроорганизма устанавливается только с момента его точного описания.

В результате проведенных исследований, установлена видовая принадлежность исследуемых микроорганизмов. Она подтверждена амплификацией фрагментов генов 16S рРНК (в случае прокариота стрептомицета) и 18S рРНК (в случае эукариота гриба), проведенной по стандартной методике ПЦР, с привлечением данных из международной базы NCBI. Идентифицированы новые штаммы видов *Aspergillus niger* и *Streptomyces sampsonii*. Результаты исследований показывают, что биодegradация белого фосфора может осуществляться микроорганизмами из различных таксономических групп. В настоящее время описанные штаммы депонированы во Всероссийской коллекции микроорганизмов и могут стать объектом патентования.

**Ключевые слова:** белый фосфор, *Aspergillus niger* AM1, *Aspergillus niger* AM2, *Streptomyces sampsonii* A8, культуральные среды, факторы роста, морфологическое описание, таксономия.

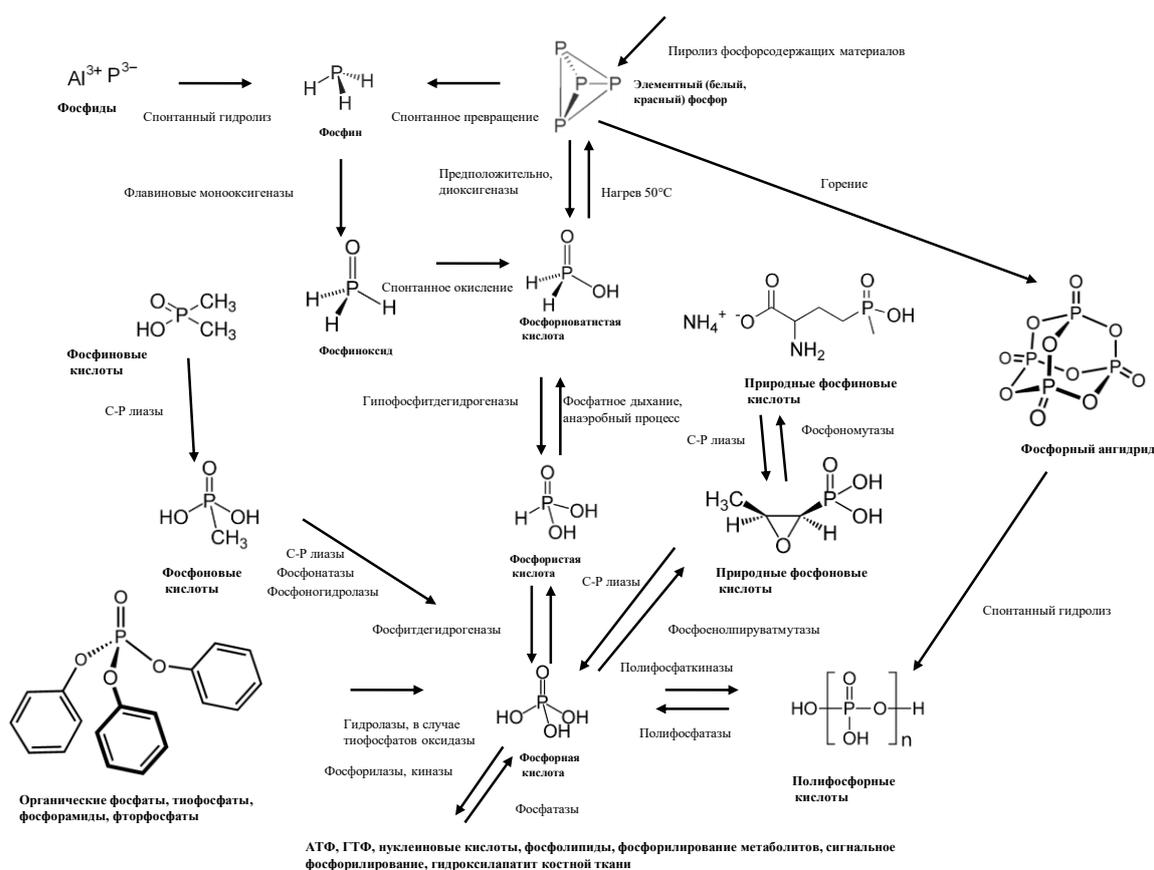
### 1. Введение

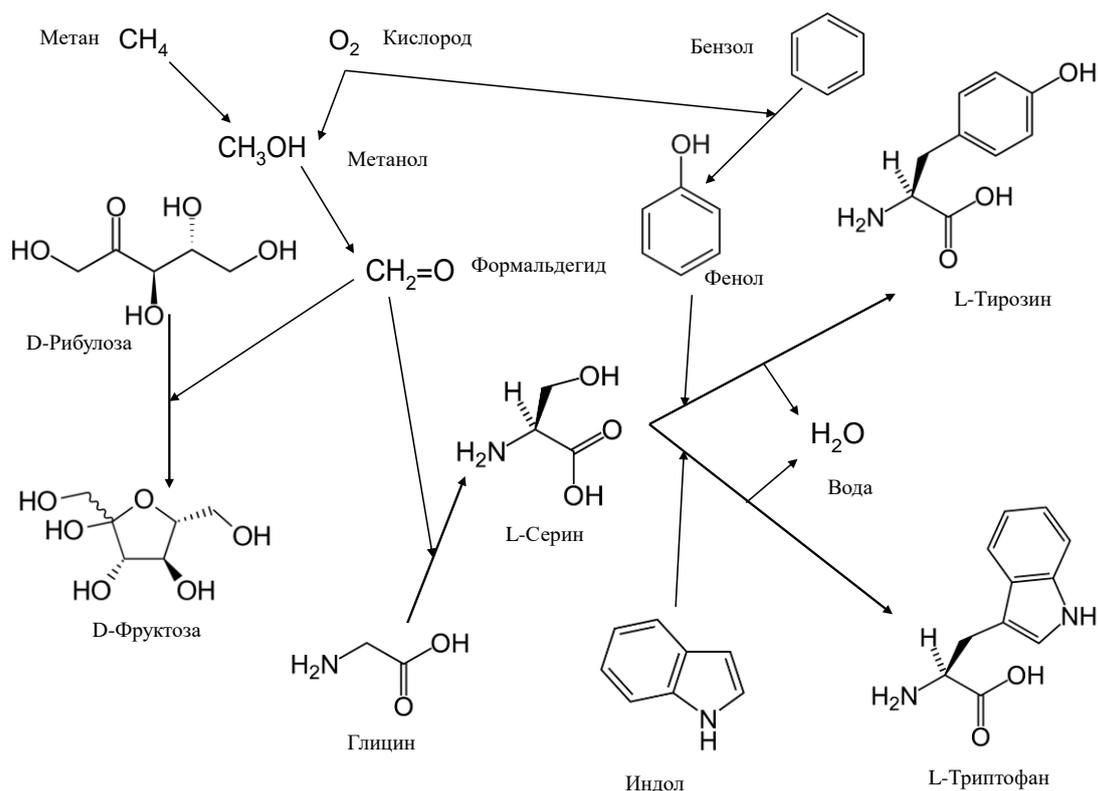
Опасность обращения и контакта с белым фосфором привела к появлению значительного числа работ посвященных его обезвреживанию. Как правило, обезвреживание заключается в окислении белого фосфора до фосфорной кислоты сильными окислителями (например, смесь азотной и серной кислот), которые сами по себе представляют угрозу для окружающей среды [38].

Между тем, все большую популярность приобретает метод биодegradации токсичных отходов [32]. Биосфера нашей планеты в течение миллиардов лет совершенствовала методы ликвидации токсичных соединений. Многообразие метаболических путей лежит в основе биодegradации. Схема метаболических путей соединений фосфора в различных степенях окисления, построенная по литературным данным [1, 13, 14, 17, 23, 29, 31, 33, 34, 42] и

нашим собственным исследованиям, приведена на рисунке 1, вверху. На рисунке 1, внизу представлена схема, весьма показательная отображающая пример того, как два ядовитых вещества превращаются в одно полезное. Включение формальдегида и фенола (бензола, индола) в состав сахаров и аминокислот – блестящий пример биодegradации. Окисление метана [4] до метанола кислородом [15, 25, 40] осуществляется метанотрофными бактериями [37, 39], серина и фруктозы из метанола – некоторыми метилотрофными бактериями и дрожжами [16, 19], тирозина из фенола – *Escherichia intermedia* [19, 20, 43], триптофана из индола – бактериями, растениями и грибами [12, 18], фенола из бензола – цитохромом P450 млекопитающих [28, 30]. Аналогично, к серину или (значительно чаще) его метаболиту цистеину может присоединяться синильная кислота с образованием β-цианоаланина, который далее гидролизуется ферментом нитрилазой до аминокислот аспарагина и аспарагиновой кислоты [24, 27]. Изображенный на схеме глицин может являться метаболитом еще одного (уже четвертого!) ксенобиотика – гербицида глифосата, который бактериями *Pseudomonas aeruginosa* разлагается до полезных аминокислоты и фосфата [22, 36]. Фенол может образовываться и в результате метаболизма пластификатора и антипирена трифенилфосфата [17]. Включение нескольких токсичных ксенобиотиков (метан, бензол или фенол, индол, синильная кислота, глифосат) в состав сахаров и аминокислот, является, пожалуй, наиболее показательным примером биодegradации.

Приведенные сведения являются весомым фундаментальным аргументом в пользу возможности биодegradации даже такого ксенобиотика, как белый фосфор.





**Рис. 1.** Вверху. Схема метаболических и абиогенных путей превращений соединений фосфора.

Внизу. Схема усвоения сразу нескольких токсичных веществ в едином метаболическом пути, демонстрирующая совершенство биохимических процессов микроорганизмов. Изображена на основе литературных источников. Рисунки выполнил А.З. Миндубаев

В предыдущих работах [5-10] нам впервые удалось наблюдать биологическое обезвреживание опасного экотоксиканта белого фосфора. Круг микроорганизмов, осуществляющих его биodeградацию, уже определен. Логичен переход к дальнейшему описанию морфологии и свойств данных культур микробов.

Морфологическое, биохимическое и таксономическое описания штаммов микробов имеют важнейшее значение. Во-первых, сам факт существования штамма подтверждается только после описания набора его свойств. У каждой культуры микробов он свой, уникальный. Во-вторых, описание открывает возможность коллекционирования штаммов. Коллекции культур при поступлении нового штамма осуществляют процедуру депонирования, присваивают номер и регистрируют с выдачей паспорта, в котором прописаны его свойства. Депонирование в коллекции превращает штамм в объект интеллектуальной собственности и позволяет его патентовать – это уже в-третьих. Наконец, в-четвертых описание свойств штамма позволяет подбирать оптимальные условия его культивирования и хранения, своевременно отбраковывать фенотипические отклонения, свидетельствующие о вырождении штамма.

Задача исследований состояла в реализации перечисленных возможностей.

## 2. Материалы и методы

Штамм *Streptomyces* sp. A8 (Рисунок 2, справа).

Штамм выделен 10. 09. 2012 г. в среде Гаузе 1 с минеральным азотом из осадка сточных вод Муниципального унитарного предприятия Водоканал г. Казани, после предварительного добавления в осадок эмульсии белого фосфора.

Штамм *Aspergillus niger* Tiegh AM1.

Дата обнаружения штамма – 07.10.2014 г. Выделен из навески белого фосфора, приобретенного в ПАО «Химпром» (г. Новочебоксарск). Вещество технической чистоты. Куски этого вещества хранились в банке из темного стекла, заполненной водой.

Штамм *Aspergillus niger* Tiegh AM2.

Дата выделения штамма AM2 08.12.2016 г. Штамм получен в процессе отбора при культивировании *Aspergillus niger* AM1 в жидкой модифицированной среде Приджем-Готлиба с 0.2 % белого фосфора по большей скорости роста (на четвертые сутки после посева разница составила 1.5 раза) и продукции оранжевого пигмента в сравнении с исходным штаммом.

Морфологическое описание культур исследуемых штаммов *A. niger* и *Streptomyces* sp. A8 производилось при помощи микроскопа Carl Zeiss Observer A1.

Для генетической идентификации микромицета, устойчиво метаболизирующего белый фосфор и по морфологическим признакам отнесенного к виду *A. niger*, была определена нуклеотидная последовательность его регионов ITS1 и ITS2 (Internal Transcribed Spacer, между 18S и 25S рибосомальными генами, включающий 5.8S ген): транскрибируемые спейсеры между генами 18S – 5.8S, и 5.8S – 28S генами рРНК, соответственно. Фрагмент ITS1 и ITS2 амплифицировали с помощью праймеров LR1 5'-GGTTGGTTTCTTTTCCT-3' и ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'. Протокол ПЦР был следующим: начальная денатурация при 94 °С в течение 4 мин; 35 циклов денатурирования при 94 °С в течение 30 с, отжиг при 51 °С в течение 30 с, элонгация при 72 °С в течение 1 мин; и окончание элонгации при 72 °С в течение 5 мин. Продукты ПЦР разделяли на 2 % агарозном геле при 80 В в течение 70 минут. Полосы ДНК были обнаружены в свете УФ-лампы, а затем выделены с использованием комплекта для очистки геля - Термофишер.

Нуклеотидную последовательность полученного фрагмента определяли по методу Сэнгера. Полученную последовательность сравнивали с аналогичными последовательностями в базе данных GenBank с помощью программы BLAST. Сравнение полученной последовательности с последовательностями базы данных GenBank с помощью системы BLAST, выявила 99 % гомологию с ITS1 и ITS2 регионами описанных штаммов *Aspergillus niger* NJA-1(Асс. KJ365316.1) и KAML02 (KC119204.1), что позволяет идентифицировать данный микроорганизм как новый штамм *Aspergillus niger*. Ему мы присвоили номер *A. niger* AM1. Нуклеотидная последовательность штамма введена в базу данных GenBank, где ей присвоен номер KT805426.

ПЦР амплификацию фрагментов генов 16S рРНК проводили по стандартной методике с использованием синтезированных универсальных прокариотических праймеров: прямого – (fD1) – 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' и обратного – (Rs16) – 5'-TACGGCTACCTGTTACGACTT-3' [26].

Проведен биохимический анализ штамма *Streptomyces* sp. A8 с помощью системы Biolog, позволяющей на основе скрининг-теста получать метаболический профиль по 94 пищевым субстратам. Метаболическое профилирование *S. sp. A8* проводили с помощью системы GEN III OmniLog® II Combo Plus (Biolog, Inc., Хейворд, США) в микропланшетах GEN III. Планшеты были инокулированы штаммами *S. sp. A8* в двух повторах согласно протоколу производителя и инкубировались при 28°C [21]. Определяли оптическую плотность при 590 нм по снижению содержания тетразолия фиолетового, который реагирует на окисление субстратов, через каждые 24 часа.

Секвенирование амплифицированного фрагмента гена 16S рРНК стрептомицета проведено в ЗАО Евроген (г. Москва); ПЦР проводился на кафедре биохимии КФУ.

Сравнение антагонистических свойств *Streptomyces* sp. А8 и шести других штаммов стрептомицетов рода *Streptomyces* описано в статье [11].

### 3. Результаты и их обсуждение

Штамм *Streptomyces* sp. А8. Идентификация *Streptomyces* sp. А8 проведена с использованием анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК и культурально-морфологических характеристик. Определение уровня сходства с типовыми штаммами ближайших видов проводилось с использованием ресурсов и алгоритмов сайта EzBioCloud ([www.ezbiocloud.net](http://www.ezbiocloud.net)). Определение видовой принадлежности по культурально-морфологическим характеристикам штамма проведено по определителю актиномицетов [41]. На основании полученных данных по морфологии, видовая принадлежность штамма А8 была определена как *Streptomyces xanthocidicus*, однако исследование геномики ее не подтвердило.

Характерные признаки штамма *Streptomyces* sp. А8 (рис. 2, справа). Цепочки спор прямые, споры с гладкой поверхностью – установлено методом оптической микроскопии. На минеральном агаре (Гаузе1) [3], воздушный мицелий (ВМ) светло-серого цвета, субстратный мицелий (СМ) буроватый, серовато-коричневый, не содержит растворимый пигмент (РП). На овсяном агаре ВМ имеет серый цвет, СМ – бесцветный, РП отсутствует. На глицерин-нитратном агаре ВМ светло-серый, СМ желто-серый, РП отсутствует. На органическом агаре ВМ белый или светло-серый, СМ желтоватый до буроватого, РП нет. Меланоидные пигменты не образует. Физиолого-биохимические признаки следующие. Штамм *Streptomyces* sp. А8 утилизирует глюкозу, также обладает гидролитической активностью в отношении крахмала. Восстанавливает нитраты до нитритов.

Метаболическое профилирование *Streptomyces* sp. А8 продемонстрировало предпочтения стрептомицета к составу культуральной среды. Например, на метилглюкозиде в качестве источника углерода культура быстро растет, а при росте на слизи (галактаровой) кислоте к концу недели ее плотность остается прежней (табл. 1).

**Таблица 1.** Сравнение роста *Streptomyces* sp. А8 на 94 пищевых субстратах, на планшете GEN III MicroPlate™ (Рост оценивается по изменению оптической плотности при  $\lambda = 590$  нм, прямо пропорциональной плотности культуры)

Субстраты/Сутки	1	2	3	4	6	7
Отрицательный контроль	0,171	0,16	0,182	0,186	0,204	0,184
Декстрин	0,452	1,034	1,107	1,057	1,049	1,049
D-Мальтоза	0,173	0,227	0,29	0,344	0,529	0,594
D-Трегалоза	0,193	0,369	0,607	0,833	1,333	1,406
D-Целлобиоза	0,397	1,13	1,266	1,324	1,344	1,246
Генциобиоза	0,22	0,485	0,779	1,013	1,183	1,27
Сахароза	0,166	0,145	0,154	0,157	0,17	0,179
D-Тураноза	0,212	0,195	0,211	0,218	0,265	0,318
Стахиоза	0,168	0,156	0,166	0,168	0,176	0,173
Положительный контроль	1,009	1,615	1,562	1,467	1,616	1,758
pH 6	0,934	1,745	1,633	1,606	1,619	1,682

pH 5	0,441	1,314	1,544	1,446	1,542	1,535
D-Рафиноза	0,181	0,16	0,166	0,171	0,211	0,18
$\alpha$ -D-Лактоза	0,173	0,162	0,174	0,179	0,189	0,194
D-Мелибиоза	0,161	0,148	0,158	0,161	0,171	0,174
$\beta$ -Метил-D-глюкозид	0,197	0,291	0,454	0,6	0,86	0,933
D-Салицин	0,197	0,266	0,373	0,459	0,667	0,748
N-Ацетил-D-глюкозамин	0,196	0,279	0,381	0,442	0,578	0,622
N-Ацетил- $\beta$ -D-маннозамин	0,18	0,18	0,194	0,203	0,243	0,237
N-Ацетил-D-галактозамин	0,185	0,179	0,188	0,196	0,217	0,226
N-Ацетилнейраминная кислота	0,348	0,819	1,122	1,14	1,062	1,021
1% NaCl	1,456	1,832	1,819	1,488	1,386	1,551
4% NaCl	0,947	1,771	1,679	1,597	1,5	1,452
8% NaCl	1,526	2,044	1,793	1,719	1,792	1,893
$\alpha$ -D-Глюкоза	0,252	0,515	0,839	1,097	1,12	1,129
D-Манноза	0,238	0,424	0,644	0,873	1,234	1,268
D-Фруктоза	0,318	0,724	1,074	1,162	1,211	1,238
D-Галактоза	0,302	0,581	0,923	1,142	1,299	1,375
3-Метилглюкоза	0,171	0,159	0,166	0,17	0,181	0,182
D-Фукоза	0,188	0,174	0,18	0,185	0,198	0,202
L-Фукоза	0,224	0,211	0,222	0,229	0,247	0,25
L-Рамноза	0,176	0,162	0,174	0,179	0,193	0,198
Инозин	0,295	0,474	0,649	0,774	0,988	1,059
1% Лактат натрия	0,89	1,695	1,732	1,565	1,48	1,486
Фузидовая кислота	0,161	0,167	0,19	0,2	0,254	0,26
D-Серин	0,124	0,14	0,168	0,23	0,395	0,458
D-Сорбит	0,206	0,188	0,192	0,195	0,199	0,203
D-Маннит	0,288	0,652	0,962	1,108	1,218	1,159
D-Арабит	0,332	0,621	1,006	1,219	1,257	1,298
Мио-инозит	0,179	0,164	0,17	0,175	0,188	0,192
Глицерин	0,256	0,444	0,618	0,809	1,239	1,315
D-Глюкозо-6-фосфат	0,209	0,234	0,299	0,361	0,508	0,517
D-Фруктозо-6-фосфат	0,307	0,333	0,376	0,412	0,523	0,552
D-Аспарагиновая кислота	0,137	0,143	0,149	0,147	0,155	0,156
D-Серин	0,101	0,132	0,148	0,16	0,183	0,169
Тролеандомицин	0,139	0,159	0,178	0,19	0,214	0,225
Рифамицин SV	0,15	1,286	1,652	1,646	1,722	1,699
Миноциклин	0,167	0,177	0,196	0,216	0,244	0,253
Желатин	0,506	0,638	0,723	0,776	0,84	0,829
Глицил-L-пролин	0,426	0,637	0,836	0,983	1,144	1,198
L-Аланин	0,246	0,342	0,447	0,539	0,727	0,807
L-Аргинин	0,186	0,178	0,191	0,202	0,222	0,225
L-Аспарагиновая кислота	0,271	0,464	0,761	0,81	0,796	0,801

L-Глутаминовая кислота	0,313	0,537	0,779	0,94	0,997	0,986
L-Гистидин	0,27	0,407	0,517	0,586	0,722	0,8
L-Пироглутаминовая кислота	0,196	0,181	0,193	0,194	0,202	0,21
L-Серин	0,215	0,288	0,369	0,438	0,636	0,688
Линкомицин	0,163	0,219	0,391	0,665	0,961	1,156
Гуанидина гидрохлорид	0,708	1,069	1,2	1,377	1,44	1,427
Ниапруф 4	0,15	0,169	0,17	0,179	0,187	0,193
Пектин	0,243	0,242	0,255	0,262	0,268	0,277
D-Галактуриновая кислота	0,226	0,212	0,221	0,228	0,236	0,242
L- Лактон галактуриновой кислоты	0,175	0,155	0,156	0,158	0,16	0,161
D-Глюконовая кислота	0,403	0,921	1,177	1,23	1,066	1,073
D-Глюкуроновая кислота	0,206	0,203	0,214	0,228	0,236	0,247
Глюкуроновая кислота	0,257	0,271	0,31	0,333	0,373	0,386
Слизевая кислота	0,199	0,177	0,18	0,184	0,199	0,2
Хинная кислота	0,165	0,156	0,167	0,169	0,185	0,187
D-Глюкоаровая кислота	0,184	0,167	0,18	0,183	0,202	0,201
Ванкомицин	0,146	0,162	0,181	0,196	0,227	0,245
Тетразолий фиолетовый	0,39	0,42	0,405	0,392	0,471	0,425
Тетразолий синий	0,298	0,324	0,33	0,336	0,283	0,265
П-Гидроксифенилуксусная к-та	0,184	0,154	0,154	0,156	0,161	0,162
Метилпируват	0,352	0,608	0,624	0,61	0,619	0,622
Метил-D-лактат	0,211	0,194	0,199	0,207	0,219	0,221
L-Молочная кислота	0,342	1,062	1,165	1,211	1,188	1,128
Лимонная кислота	0,241	0,532	0,88	0,976	0,999	0,997
$\alpha$ -Кетоглутаровая кислота	0,2	0,218	0,245	0,251	0,271	0,28
D-Яблочная кислота	0,24	0,255	0,281	0,285	0,304	0,306
L-Яблочная кислота	0,498	1,025	1,024	0,967	0,977	0,972
Бромантарная кислота	0,433	0,436	0,497	0,515	0,564	0,55
Налидиксовая кислота	0,975	1,712	1,66	1,534	1,52	1,591
Хлорид лития	0,927	1,798	2,087	2,118	1,918	1,792
Теллурид калия	0,172	0,188	0,219	0,241	0,267	0,266
Твин 40	0,395	0,566	0,617	0,643	0,69	0,694
$\gamma$ -Аминомасляная кислота	0,25	0,266	0,297	0,314	0,328	0,334
$\alpha$ -Гидроксимасляная кислота	0,347	0,919	1,141	1,213	1,35	1,399
$\beta$ -Гидрокси-D,L-масляная кислота	0,263	0,41	0,511	0,592	0,684	0,713
$\alpha$ -Кетомасляная кислота	0,396	0,627	0,791	0,936	1,143	1,216
Ацетоуксусная кислота	0,27	0,265	0,277	0,282	0,289	0,292
Пропионовая кислота	0,29	0,442	0,474	0,523	0,631	0,703
Уксусная кислота	0,25	0,432	0,657	0,835	1,099	1,078
Муравьиная кислота	0,209	0,222	0,245	0,264	0,306	0,335
Азтреонам	0,865	1,12	1,107	1,141	1,501	1,558

Бутират натрия	0,74	1,608	1,705	1,496	1,397	1,397
Бромат натрия	1,142	1,874	1,721	1,564	1,326	1,309

*Примечание:* цвета ячеек таблицы коррелируют с величиной значений – чем больше величина, тем ближе к зеленой полосе спектра.

Длительность культивирования в среде Гаузе-1 до зрелого воздушного мицелия 3–4 суток при температуре 28 °С.

Рекомендуемые методы / условия сохранения:

Для длительного хранения культуру замораживают (–80 °С) в 30 % глицерине. Также возможно хранение в ампулах в лиофилизированном состоянии (защитная среда – обезжиренное молоко).

При секвенировании амплифицированного фрагмента гена 16S рРНК получена нуклеотидная последовательность размером 1209 нуклеотидов. Результаты анализа фрагмента гена 16S рРНК показали, что штамм А8 относится к роду *Streptomyces*, поскольку процент сходства с 30 типовыми штаммами ближайших видов *Streptomyces* составляет, согласно данным с сайта EzBioCloud, от 98.4 до 99.67 %, наиболее близок (99.67 %) к типовому штамму *Streptomyces albidoflavus* DSM 40455T. Однако данный процент сходства не позволяет установить видовую принадлежность штамма – для этого показатель должен составить не менее 99.9 % сходства с конкретным видом. Для штамма А8 сходство по нуклеотидным последовательностям 16S рДНК (амплификация праймерами fD1 и rP2) сравниваемых фрагментов стрептомицетов, выбранных из базы данных NCBI, и тестируемых изолятов, составляло 99.6–99.7 % (Таблица 2).

**Таблица 2.** Сходство (%) нуклеотидных последовательностей консервативного фрагмента 16S рРНК выделенных изолятов и 9 типовых штаммов ближайших видов стрептомицетов из базы данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), определенное с помощью множественного выравнивания в программе BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Эталонные виды стрептомицетов	Условное обозначение изолята
<i>S. sampsonii</i>	<b>99.74</b>
<i>S. coelicolor</i>	99.61
<i>S. lividans</i>	99.48
<i>S. albidoflavus</i>	99.61
<i>S. hydrogenans</i>	99.61
<i>S. koyangensis</i>	99.61
<i>S. albus</i>	99.61
<i>S. violascens</i>	99.61

<i>S. exfoliatus</i>	99.61
----------------------	-------

В частности, наибольшее сходство, 99.74 % было установлено между изолятом А8 и *Streptomyces sampsonii*. С семью видами: *S. coelicolor*, *S. albidoflavus*, *S. hydrogenans*, *S. koyangensis*, *S. albus*, *S. violascens* и *S. exfoliatus* процент сходства составлял 99.61 %, с *S. lividans* 99.48 %. Соответственно, наш штамм предложено относить к виду *S. sampsonii*. Тем не менее, следует подчеркнуть, что определенное всеми примененными методами родство достаточно дальнее, и установленная видовая принадлежность микроорганизма остается дискуссионной.

Штамм А8, выделенный из ОСВ с химическим токсикантом белым фосфором, резко отличается от четырех других штаммов отсутствием выработки фитотоксинов и антибиоза с высшими растениями. Столь резкое отличие может быть объяснено двумя основными причинами. Во-первых, высшие растения не встречаются в среде обитания А8 (сточные воды), поэтому адаптации к конкурентной борьбе с ними ему не требуются. В таком случае, фитотоксичность у предковых форм А8 отсутствовала еще до внесения белого фосфора в ОСВ. Во-вторых, присутствие белого фосфора делает среду настолько токсичной, что А8 не нуждается в выработке собственных токсинов – конкурентная борьба в такой среде сильно ослаблена по причине невозможности роста в ней большинства организмов. В этом случае штамм утратил фитотоксичность под влиянием химического загрязнения среды обитания. Способность штамма А8 угнетать бациллы и зеленые водоросли (организмы, постоянно обитающие в ОСВ) делает более правдоподобной первую причину [11].

#### Штамм *Aspergillus niger* Tiegh AM1.

Культурально-морфологические и микроскопические особенности штамма.

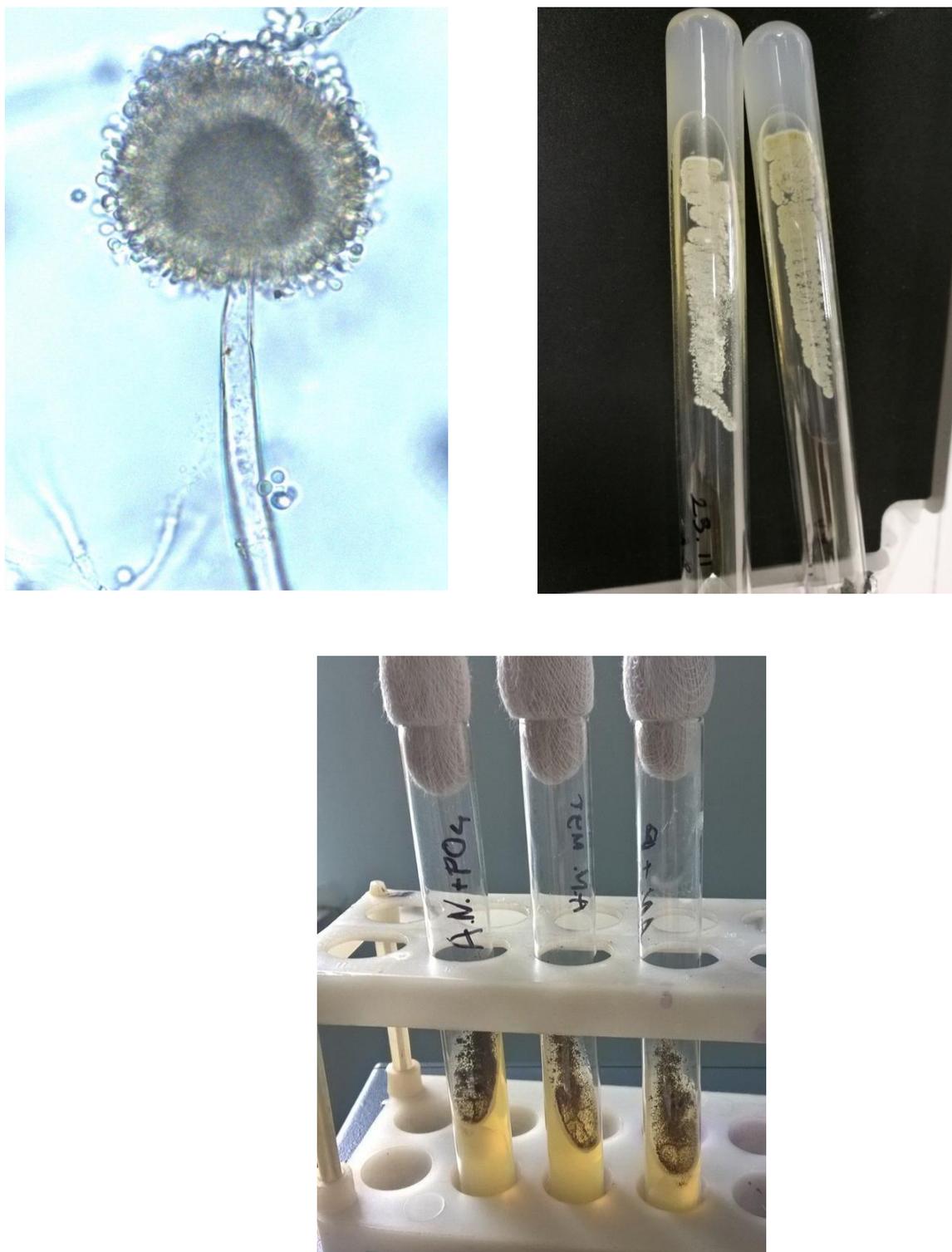
Колонии на картофельно-глюкозном агаре (КГА) при 25 °С через 9 суток имеют диаметр 58 мм, черные, поверхность зернистая, край ровный; мицелий белый, септированный, экссудат в чашке не обнаружен. Конидиальные головки шаровидные. Конидиеносцы (стайпы) несептированные, гладкостенные, со средним размером 960–1150 мкм × 9–11 мкм. Везикулы сферические, диаметр около 58 мкм; стеригмы двухъярусные, метулы очень плотно покрывают всю поверхность везикулы. Конидии черные, шаровидные, около 4 мкм в диаметре, толстостенные, поверхность шероховатая (рисунок 2, слева).

При росте на высоких (более 0.2 %) концентрациях белого фосфора мицелий гриба приобретает желтый цвет. Температура культивирования 25 °С. Культура растет на картофельно-глюкозном агаре (КГА). Срок выращивания 7 суток.

Споры аспергилла хранятся в пробирке с завинчивающейся крышкой, заполненной 30 % водным глицерином, при температуре –30 °С. Срок хранения 2 года и более.

Культура относится к IV группе патогенности в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителям паразитарных болезней» (СП 1.3.2322-08), утвержденными Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ №4 от 28 января 2008 г.

Определение культурально-морфологических характеристик штамма проведены с использованием сайта коллекции CBS (Голландия) <http://www.westerdijkinstituut.nl/> и определителя [2].



**Рис.2.** Слева: микрофотография конидиеносца *A. niger* AM1, полученная в процессе описания морфологии этой культуры. Микроскоп Carl Zeiss Observer A1. Справа: *Streptomyces* sp. A8, подготовленный к отправке во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов. Через трое суток после посева. Внизу: штаммы *Aspergillus niger* AM1 и AM2, готовые к отправке во Всероссийскую коллекцию микроорганизмов.

#### Штамм *Aspergillus niger* Tiegh AM2.

Миндубаев А. З., Сапармырадов К. А., Акосах Йав Абайе, Бабынин Э. В., Минзанова С. Т., Волошина А. Д., Характеристика штаммов микроорганизмов, устойчивых к присутствию в среде белого фосфора // «Живые и биокосные системы». – 2020. – № 33; URL: <https://jbks.ru/archive/issue-33/article-1/>. DOI: 10.18522/2308-9709-2020-33-1

Фенотипические признаки, схожие с исходным предковым штаммом AM1 (рисунок 2, внизу).

Культурально-морфологические и микроскопические особенности штамма. Колонии на КГА при 25 °С за 7 суток имеют диаметр 45 – 48 мм, черные, поверхность зернистая, край ровный; мицелий белый, септированный, в чашке экссудат не обнаружен. Конидиальные головки шаровидные. Конидиеносцы несептированные, гладкостенные, со средним размером 870–1140 мкм × 8–10 мкм. Везикулы (апикальные расширения) сферические, диаметр около 47 мкм; стеригмы двухъярусные, метулы очень плотно покрывают всю поверхность везикулы. Конидии черно-коричные, шаровидные, 3-4 мкм в диаметре, толстостенные, поверхность шероховатая.

Мицелий гриба и культуральная среда приобретает оранжевый цвет, иногда маскирующийся черным при спороношении.

#### 4. Заключение

Проведенные исследования показали, что способностью к деструкции белого фосфора обладают представители грибов и стрептомицетов – микроорганизмов, состоящих в очень дальнем родстве. Выполнено морфологическое, биохимическое и таксономическое описание новых культур *Aspergillus niger* и *Streptomyces sampsonii*. Перспективен поиск потенциальных деструкторов в других таксономических группах.

Получен научно-технический задел для дальнейшего создания коллекционных штаммов микроорганизмов, обезвреживающих белый фосфор, их депонирования и патентования. В ближайшей перспективе возможно создание коммерческих биопрепаратов на основе обнаруженных нами штаммов стрептомицетов и аспергиллов.

#### Литература

1. Авдеева Л.В., Алейникова Т.Л., Андрианова Л.Е., Белушкина Н.Н., Волкова Н.П., Воробьева С.А., Голенченко В.А., Губарева А.Е., Корлякова О.В., Лихачева Н.В., Павлова Н.А., Рубцова Г.В., Силаева С.А., Силуянова С.Н., Титова Т.А. // Биохимия: учебник. Под редакцией Е.С. Северина. 5-е изд., испр. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2013. 768 с.
2. Билай В.И., Коваль Э.З. Аспергиллы. Определитель. Киев, Наук. Думк. 1988. 204 с.
3. Гаузе Г.Ф., Преображенская Т.П., Свешникова М.А, Терехова Л.П., Максимова Т.С. Определитель актиномицетов. М.: Наука. 1983. 248 с.
4. Караева Ю.В., Миндубаев А.З., Исламова С.И., Камалов Р.Ф., Марфин Е.А. Влияние ультразвуковой обработки на эффективность процесса получения биогаза // Энергосбережение и водоподготовка. 2018. №1(111). С. 60-66.
5. Миндубаев А.З. Микроорганизмы деструкторы и их роль в очистке природных сред (обзор) // Живые и биокосные системы. 2020. № 31. С. 1-20.
6. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г. Влияние на биодеградацию белого фосфора состава культуральных сред и видовой принадлежности микроорганизмов // Biogeosystem Technique. 2019. Т.6. №2. С.102-113. DOI: 10.13187/bgt.2019.2.102
7. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Бадеева Е.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Низамов И.С., Хаяров Х.Р., Акосах Й.А. Метаболизм соединений фосфора и таксономическое положение гриба *Aspergillus niger* AM1 // Бутлеровские сообщения. 2020. Т. 62. №6. С. 98-124. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/20-62-6-98

Миндубаев А. З., Сапармырадов К. А., Акосах Йав Абайе, Бабынин Э. В., Минзанова С. Т., Волошина А. Д., Характеристика штаммов микроорганизмов, устойчивых к присутствию в среде белого фосфора // «Живые и биокосные системы». – 2020. – № 33; URL: <https://jbks.ru/archive/issue-33/article-1/>. DOI: 10.18522/2308-9709-2020-33-1

8. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Волошина А.Д., Акосах Й. А., Сапармырадов К.А., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Бадеева Е.К. О биологической деградации белого фосфора // Живые и биокосные системы. 2019. №28. С. 1-24.
9. Миндубаев А.З., Бабынин Э.В., Волошина А.Д., Бадеева Е.К., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г., Акосах Й.А. Биологическая детоксикация белого и красного фосфора // Южно-Сибирский научный вестник. 2020. № 4(32). С.73-81.
10. Миндубаев А.З., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Рыжиков Д.В., Барсукова Т.А., Акосах Й.А., Минзанова С.Т., Миронова Л.Г. Биодegradация белого фосфора – опасного промышленного загрязнителя // Biogeosystem Technique. 2019. Т.6. №2. С. 91-101. DOI: 10.13187/bgt.2019.2.91
11. Миндубаев А.З., Сапармырадов К.А., Алимова Ф.К. Сравнение антагонистических свойств стрептомицетов из различных биотопов // Российский журнал прикладной экологии. 2016. № 3. С. 28-32.
12. Ahmed S.A., Martin B., Miles E.W.  $\beta$ -Elimination of Indole from L-Tryptophan Catalyzed by Bacterial Tryptophan Synthase: A Comparison between Reactions Catalyzed by Tryptophanase and Tryptophan Synthase // Biochemistry. 1986. Vol.25.No.15. P.4233-4240. DOI: [10.1021/bi00363a010](https://doi.org/10.1021/bi00363a010)
13. Attaway H., Nelson J., Baya A.M., Voll M.J., White W.E., Grimes D.J., Colwell R.R. Bacterial Detoxification of Diisopropyl Fluorophosphate. *Applied and environmental microbiology*. **1987**. Vol.53. No.7. P.1685-1689. DOI: 10.1128/AEM.53.7.1685-1689.1987.
14. Blasiak J., Jalszynski P., Trzeciak A., Szyfter K. In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues // Mutat Res. 1999. Vol. 445. No. 2. P. 275-283. DOI: [10.1016/s1383-5718\(99\)00132-1](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(99)00132-1)
15. Caffarri S., Tibiletti T., Jennings R.C., Santabarbara S. A Comparison Between Plant Photosystem I and Photosystem II Architecture and Functioning // Current Protein and Peptide Science. 2014. Vol.15.No.4.P. 296-331. DOI: [10.2174/1389203715666140327102218](https://doi.org/10.2174/1389203715666140327102218)
16. Chistoserdova L., Kalyuzhnaya M.G., Lidstrom M.E. The Expanding World of Methylophilic Metabolism // Annu Rev Microbiol. 2009. Vol.63. P.477-499. DOI: 10.1146/annurev.micro.091208.073600.
17. Choi Y., Jeon J., Choi Y., Kim S.D. Characterizing biotransformation products and pathways of the flame retardant triphenyl phosphate in *Daphnia magna* using non-target screening // Sci Total Environ. 2020. Vol.708. No.135106. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135106
18. Dunn M.F. Allosteric regulation of substrate channeling and catalysis in the tryptophan synthase holoenzyme complex // Archives of Biochemistry and Biophysics. 2012. Vol.519. No.2. P.154-166. DOI: 10.1016/j.abb.2012.01.016.
19. Fesko K., Gruber-Khadjawi M. Biocatalytic Methods for C–C Bond Formation // ChemCatChem. 2013. Vol.5. No.6. P.1248-1272. DOI: 10.1002/cctc.201200709
20. Fukui S., Ikeda S-i., Fujimura M., Yamada H., Kumagai H. Production of L-Tryptophan, L-Tyrosine and their Analogues by-Use of Immobilized Tryptophanase and Immobilized  $\beta$ -Tyrosinase // European J.Appl. Microbiol. 1975. Vol.1. P.25-39.
21. Garland J.L., Mills A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization // Appl. Environ. Microbiol. 1991. Vol. 57. No. 8. P. 2351-1359. DOI: 10.1128/AEM.57.8.2351-2359.1991.
22. Grandcoin A., Piel S., Baures E. AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters: Its sources, behavior and environmental fate // Water Research. 2017. Vol.117. No.187e197. P.187-197. DOI: [10.1016/j.watres.2017.03.055](https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.055)
23. Hemmilä M. , Hihkiö M., Kasanen J.-P., Turunen M., Järvelä M., Suhonen S., a Pasanen A.-L., Norppa H.. Cytotoxicity and genotoxicity in vitro and irritation potency in vivo of two red phosphorus-based

pyrotechnic smokes // *Mutation Research*. 2010. Vol.701. No.2. P. 137-144. DOI: [10.1016/j.mrgentox.2010.06.007](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.06.007)

24. Herfurth A.-M., van Ohlen M., Wittstock U.  $\beta$ -Cyanoalanine Synthases and Their Possible Role in Pierid Host Plant Adaptation // *Insects*. 2017. Vol. 8. No.62. P.1-17. DOI:10.3390/insects8020062

25. Holloway-Phillips M. Photosynthetic Oxygen Production: New Method Brings to Light Forgotten Flux // *Plant Physiology*. 2018. Vol.177. No.1. P.7-9. DOI:10.1104/pp.18.00344

26. James T.Y., Kauff F., Schoch C.L., Matheny P.B., Hofstetter V., Cox C.J., Celio G., Gueidan C., Fraker E., Miadlikowska J., Lumbsch H.T., Rauhut A., Reeb V., Arnold A.E., Amtoft A., Stajich J.E., Hosaka K., Sung G.-H., Johnson D., O'Rourke B., Crockett M., Binder M., Curtis J.M., Slot J.C., Wang Z., Wilson A.W., Schübler A., Longcore J.E., O'Donnell K., Mozley-Standridge S., Porter D., Letcher P.M., Powell M.J., Taylor J.W., White M.M., Griffith G.W., Davies D.R., Humber R.A., Morton J.B., Sugiyama J., Rossman A.Y., Rogers J.D., Pfister D.H., Hewitt D., Hansen K., Hambleton S., Shoemaker R.A., Kohlmeyer J., Volkmann-Kohlmeyer B., Spotts R.A., Serdani M., Crous P.W., Hughes K.W., Matsuura K., Langer E., Langer G., Untereiner W.A., Lücking R., Büdel B., Geiser D.M., Aptroot A., Diederich P., Schmitt I., Schultz M., Yahr R., Hibbett D.S., Lutzoni F., McLaughlin D.J., Spatafora J.W., Vilgalys R. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny // *Nature*. 2006. Vol.443. P.818-822. DOI: 10.1038/nature05110

27. Machingura M., Salomon E., Jez J.M., Ebbs S.D. The  $\beta$ -cyanoalanine synthase pathway: beyond cyanide detoxification // *Plant, Cell and Environment*. 2016. Vol.39. No.10. P.2329-2341. DOI: 10.1111/pce.12755.

28. Melikian A.A., O'Connor R., Prahalad A.K., Hu P., Li H., Kagan M., Thompson S. Determination of the urinary benzene metabolites S-phenylmercapturic acid and *trans,trans*-muconic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Carcinogenesis*. 1999. Vol.20. No.4. P. 719-726. DOI: [10.1093/carcin/20.4.719](https://doi.org/10.1093/carcin/20.4.719)

29. Metcalf W.W., van der Donk W.A. Biosynthesis of Phosphonic and Phosphinic Acid Natural Products // *Annu Rev Biochem*. 2009. Vol.78. P.65-94. DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.091707.100215

30. Morgan J., Greenberg A. Insights into the Formation and Isomerization of the Benzene Metabolite Muconaldehyde and Related Molecules: Comparison of Computational and Experimental Studies of Simple, Benzo-Annulated, and Bridged 2,3-Epoxyoxepins // *J. Org. Chem*. 2010. Vol.75. No.14. P.4761-4768. DOI: 10.1021/jo100610g

31. Nath N.S., Bhattacharya I., Tuck A.G., Schlipalius D.I., Ebert P.R. Mechanisms of Phosphine Toxicity // *Journal of Toxicology*. 2011. Vol.2011. No.3. P.1-9. DOI: [10.1155/2011/494168](https://doi.org/10.1155/2011/494168)

32. Neilson A.H., Allard A.-S. Environmental Degradation and Transformation of Organic Chemicals CRC Press, Taylor & Francis Group, New York. 2nd Edition. 2012. 1047 p.

33. Ohtake H., Kato J., Kuroda A., Wu H., Ikeda T. Regulation of bacterial phosphate taxis and polyphosphate accumulation in response to phosphate starvation stress // *J. Biosci*. Vol.23. No.4. P.491-499. DOI: [10.1007/BF02936143](https://doi.org/10.1007/BF02936143)

34. Petkowski J.J., Bains W., Seager S. Natural Products Containing 'Rare' Organophosphorus Functional Groups // *Molecules*. 2019. Vol.24(5). No.866. P.1-66. DOI: [10.3390/molecules24050866](https://doi.org/10.3390/molecules24050866)

35. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 1977. Vol.74. No.12. P. 5463-5467. DOI:[10.1073/pnas.74.12.5463](https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463)

36. Singh B.K., Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds // *FEMS Microbiol Rev*. 2006. Vol.30. No.3. P. 428-471. DOI: [10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x)

37. Sirajuddin S., Rosenzweig A.C. Enzymatic Oxidation of Methane // *Biochemistry*. 2015. 54(14): 2283-2294. DOI: [10.1021/acs.biochem.5b00198](https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00198)

Миндубаев А. З., Сапармырадов К. А., Акосах Йав Абайе, Бабынин Э. В., Минзанова С. Т., Волошина А. Д., Характеристика штаммов микроорганизмов, устойчивых к присутствию в среде белого фосфора // «Живые и биокосные системы». – 2020. – № 33; URL: <https://jbks.ru/archive/issue-33/article-1/>. DOI: 10.18522/2308-9709-2020-33-1

38. Sullivan J.M., Trasher R.D., Edwards R.E. Recovery of phosphates from elemental phosphorus bearing wastes. Patent US No 5275639. 1994.
39. Tinberg C.E., Lippard S.J. Oxidation reactions performed by soluble methane monooxygenase hydroxylase intermediates H<sub>peroxo</sub> and Q proceed by distinct mechanisms // *Biochemistry*. 2010. Vol.49. No.36. P.7902-7912. DOI: 10.1021/bi1009375
40. Valentine J.S., Greenberg A., Foote C.S., Liebman J.F. Active Oxygen in Biochemistry // Springer. 1995. 463 p. DOI: [10.1007/978-94-011-0609-2](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0609-2)
41. Waksman S.A. The Actinomycetes. Classification, Identification and Description of Genera and Species // Baltimore: The Williams and Wilkins Company. 1961. 2: 61-292.
42. White A.K., Metcalf W.W. Microbial Metabolism of Reduced Phosphorus Compounds // *Annu. Rev. Microbiol.* 2007. Vol.61. P.379-400. DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093357
43. Yamada H., Kumagai H. Synthesis of L-Tyrosine-Related Amino Acids by  $\beta$ -Tyrosinase // *Advances in Applied Microbiology*. 1975. Vol.19. P.249-288. DOI: [10.1016/s0065-2164\(08\)70431-3](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(08)70431-3)

## References

1. Avdeeva L.V., Aleinikova T.L., Andrianova L.E., Belushkina N.N., Volkova N.P., Vorobyova S.A., Golenchenko V.A., Gubareva A.E., Korlyakova O.V., Likhachev N.V., Pavlova, N.A. Rubtsova G.V., Silaeva S.A., Siluyanov S.N., Titov T.A. // *Biochemistry: a textbook*. Ed. E.S. Severin. 5th ed., Rev. and add. M.: GEOTAR-Media. 2013. P. 768.
2. Bilai V.I., Koval E.Z. *Aspergilla*. Determinant. Kiev: Science. 1988. Dumk. 204 p. (In Russian).
3. Gauze G.F., Preobrazhenskaya T.P., Sveshnikova M.A., Terekhova L.P., Maksimova T.S. The determinant of actinomycetes. 1983. M: Nauka. 248 p. (In Russian).
4. Karaeva Yu.V., Mindubaev A.Z., Islamova S.I., Kamalov R.F., Marfin E.A. Influence of ultrasonic pre-treatment on efficiency of the biogas production process // *Energy saving and water treatment*. 2018. No.1(111). P. 60-66. (In Russian).
5. Mindubaev A.Z. Microorganisms destructors and their role in the purification of natural environments (review) // *Living and bio-inert systems*. 2020. No.31. P.1-20. (In Russian).
6. Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G. The Effect of Culture Media Composition and Microorganism Species Affiliation on the Biological Destruction of White Phosphorus // *Biogeosystem Technique*. 2019. Vol.6. No.2. P.102-113. DOI: 10.13187/bgt.2019.2.102 (In Russian).
7. Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Nizamov I.S., Khayarov, Kh.R. Akosah Y.A. Metabolism of phosphorus compounds and taxonomic position of the *Aspergillus niger* AM1 mold // *Butlerov Communications*. 2020. Vol.62. No.6. P.98-124. DOI: 10.37952/ROI-jbc-01/20-62-6-98 (In Russian).
8. Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Voloshina A.D., Akosah Y.A., Saparmyradov K.A., Minzanova S.T., Mironova L.G., Badeeva E.K. On the biological degradation of white phosphorus // *Living and bio-inert systems*. 2019. No28. P. 1-24. (In Russian).
9. Mindubaev A.Z., Babynin E.V., Voloshina A.D., Badeeva E.K., Minzanova S.T., Mironova L.G., Akosah Y.A. White and red phosphorus biological detoxication. *South-Siberian Scientific Bulletin*. 2020. № 4(32). C.73-81. (In Russian).
10. Mindubaev A.Z., Voloshina A.D., Kulik N.V., Ryzhikov D.V., Barsukova T.A., Akosah Y.A., Minzanova S.T., Mironova L.G. Biodegradation of White Phosphorus – a Dangerous Industrial Contaminant // *Biogeosystem Technique*. 2019. Vol.6. No.2. P.91-101. DOI: 10.13187/bgt.2019.2.91 (In Russian).

Миндубаев А. З., Сапармырадов К. А., Акосах Йав Абайе, Бабынин Э. В., Минзанова С. Т., Волошина А. Д., Характеристика штаммов микроорганизмов, устойчивых к присутствию в среде белого фосфора // «Живые и биокосные системы». – 2020. – № 33; URL: <https://jbks.ru/archive/issue-33/article-1/>. DOI: 10.18522/2308-9709-2020-33-1

11. Mindubaev A.Z., Saparmyradov K.A., Alimova F.K. Comparison of antagonistic properties of *Streptomyces* from different biotopes // Russian Journal of Applied Ecology. 2016. No.3. P.28-32. (In Russian).
12. Ahmed S.A., Martin B., Miles E.W.  $\beta$ -Elimination of Indole from L-Tryptophan Catalyzed by Bacterial Tryptophan Synthase: A Comparison between Reactions Catalyzed by Tryptophanase and Tryptophan Synthase // Biochemistry. 1986. Vol.25.No.15. P.4233-4240. DOI: [10.1021/bi00363a010](https://doi.org/10.1021/bi00363a010)
13. Attaway H., Nelson J., Baya A.M., Voll M.J., White W.E., Grimes D.J., Colwell R.R. Bacterial Detoxification of Diisopropyl Fluorophosphate. *Applied and environmental microbiology*. **1987**. Vol.53. No.7. P.1685-1689. DOI: [10.1128/AEM.53.7.1685-1689.1987](https://doi.org/10.1128/AEM.53.7.1685-1689.1987).
14. Blasiak J., Jaloszynski P., Trzeciak A., Szyfter K. In vitro studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues // Mutat Res. 1999. Vol. 445. No. 2. P. 275-283. DOI: [10.1016/s1383-5718\(99\)00132-1](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(99)00132-1)
15. Caffarri S., Tibiletti T., Jennings R.C., Santabarbara S. A Comparison Between Plant Photosystem I and Photosystem II Architecture and Functioning // Current Protein and Peptide Science. 2014. Vol.15.No.4.P. 296-331. DOI: [10.2174/1389203715666140327102218](https://doi.org/10.2174/1389203715666140327102218)
16. Chistoserdova L., Kalyuzhnaya M.G., Lidstrom M.E. The Expanding World of Methylophilic Metabolism // Annu Rev Microbiol. 2009. Vol.63. P.477-499. DOI: [10.1146/annurev.micro.091208.073600](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073600).
17. Choi Y., Jeon J., Choi Y., Kim S.D. Characterizing biotransformation products and pathways of the flame retardant triphenyl phosphite in *Daphnia magna* using non-target screening // Sci Total Environ. 2020. Vol.708. No.135106. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2019.135106](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135106)
18. Dunn M.F. Allosteric regulation of substrate channeling and catalysis in the tryptophan synthase holoenzyme complex // Archives of Biochemistry and Biophysics. 2012. Vol.519. No.2. P.154-166. DOI: [10.1016/j.abb.2012.01.016](https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.01.016).
19. Fesko K., Gruber-Khadjawi M. Biocatalytic Methods for C–C Bond Formation // ChemCatChem. 2013. Vol.5. No.6. P.1248-1272. DOI: [10.1002/cctc.201200709](https://doi.org/10.1002/cctc.201200709)
20. Fukui S., Ikeda S-i., Fujimura M., Yamada H., Kumagai H. Production of L-Tryptophan, L-Tyrosine and their Analogues by-Use of Immobilized Tryptophanase and Immobilized  $\beta$ -Tyrosinase // European J.Appl. Microbiol. 1975. Vol.1. P.25-39.
21. Garland J.L., Mills A.L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization // Appl. Environ. Microbiol. 1991. Vol. 57. No. 8. P. 2351-1359. doi: [10.1128/AEM.57.8.2351-2359.1991](https://doi.org/10.1128/AEM.57.8.2351-2359.1991).
22. Grandcoin A., Piel S., Baures E. AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters: Its sources, behavior and environmental fate // Water Research. 2017. Vol.117. No.187e197. P.187-197. DOI: [10.1016/j.watres.2017.03.055](https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.055)
23. Hemmilä M. , Hihkiö M., Kasanen J.-P., Turunen M., Järvelä M., Suhonen S., a Pasanen A.-L., Norppa H. Cytotoxicity and genotoxicity in vitro and irritation potency in vivo of two red phosphorus-based pyrotechnic smokes // Mutation Research. 2010. Vol.701. No.2. P. 137-144. DOI: [10.1016/j.mrgentox.2010.06.007](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.06.007)
24. Herfurth A.-M., van Ohlen M., Wittstock U.  $\beta$ -Cyanoalanine Synthases and Their Possible Role in Pierid Host Plant Adaptation // Insects. 2017. Vol. 8. No.62. P.1-17. DOI:[10.3390/insects8020062](https://doi.org/10.3390/insects8020062)
25. Holloway-Phillips M. Photosynthetic Oxygen Production: New Method Brings to Light Forgotten Flux // *Plant Physiology*. 2018. Vol.177. No.1. P.7-9. DOI:[10.1104/pp.18.00344](https://doi.org/10.1104/pp.18.00344)
26. James T.Y., Kauff F., Schoch C.L., Matheny P.B., Hofstetter V., Cox C.J., Celio G., Gueidan C., Fraker E., Miadlikowska J., Lumbsch H.T., Rauhut A., Reeb V., Arnold A.E., Amtoft A., Stajich J.E., Hosaka K., Sung G.-H., Johnson D., O'Rourke B., Crockett M., Binder M., Curtis J.M., Slot J.C., Wang Z., Wilson

- A.W., Schübler A., Longcore J.E., O'Donnell K., Mozley-Standridge S., Porter D., Letcher P.M., Powell M.J., Taylor J.W., White M.M., Griffith G.W., Davies D.R., Humber R.A., Morton J.B., Sugiyama J., Rossman A.Y., Rogers J.D., Pfister D.H., Hewitt D., Hansen K., Hambleton S., Shoemaker R.A., Kohlmeyer J., Volkmann-Kohlmeyer B., Spotts R.A., Serdani M., Crous P.W., Hughes K.W., Matsuura K., Langer E., Langer G., Untereiner W.A., Lücking R., Büdel B., Geiser D.M., Aptroot A., Diederich P., Schmitt I., Schultz M., Yahr R., Hibbett D.S., Lutzoni F., McLaughlin D.J., Spatafora J.W., Vilgalys R. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny // *Nature*. 2006. Vol.443. P.818-822. DOI: 10.1038/nature05110
27. Machingura M., Salomon E., Jez J.M., Ebbs S.D. The  $\beta$ -cyanoalanine synthase pathway: beyond cyanide detoxification // *Plant, Cell and Environment*. 2016. Vol.39. No.10. P.2329-2341. DOI: 10.1111/pce.12755.
28. Melikian A.A., O'Connor R., Prahalad A.K., Hu P., Li H., Kagan M., Thompson S. Determination of the urinary benzene metabolites S-phenylmercapturic acid and *trans,trans*-muconic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Carcinogenesis*. 1999. Vol.20. No.4. P. 719-726. DOI: [10.1093/carcin/20.4.719](https://doi.org/10.1093/carcin/20.4.719)
29. Metcalf W.W., van der Donk W.A. Biosynthesis of Phosphonic and Phosphinic Acid Natural Products // *Annu Rev Biochem*. 2009. Vol.78. P.65-94. DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.091707.100215
30. Morgan J., Greenberg A. Insights into the Formation and Isomerization of the Benzene Metabolite Muconaldehyde and Related Molecules: Comparison of Computational and Experimental Studies of Simple, Benzo-Annulated, and Bridged 2,3-Epoxyoxepins // *J. Org. Chem*. 2010. Vol.75. No.14. P.4761-4768. DOI: 10.1021/jo100610g
31. Nath N.S., Bhattacharya I., Tuck A.G., Schlipalius D.I., Ebert P.R. Mechanisms of Phosphine Toxicity // *Journal of Toxicology*. 2011. Vol.2011. No.3. P.1-9. DOI: [10.1155/2011/494168](https://doi.org/10.1155/2011/494168)
32. Neilson A.H., Allard A.-S. Environmental Degradation and Transformation of Organic Chemicals CRC Press, Taylor & Francis Group, New York. 2nd Edition. 2012. 1047 p.
33. Ohtake H., Kato J., Kuroda A., Wu H., Ikeda T. Regulation of bacterial phosphate taxis and polyphosphate accumulation in response to phosphate starvation stress // *J. Biosci*. Vol.23. No.4. P.491-499. DOI: [10.1007/BF02936143](https://doi.org/10.1007/BF02936143)
34. Petkowski J.J., Bains W., Seager S. Natural Products Containing 'Rare' Organophosphorus Functional Groups // *Molecules*. 2019. Vol.24(5). No.866. P.1-66. DOI: [10.3390/molecules24050866](https://doi.org/10.3390/molecules24050866)
35. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 1977. Vol.74. No.12. P. 5463-5467. DOI: [10.1073/pnas.74.12.5463](https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463)
36. Singh B.K., Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds // *FEMS Microbiol Rev*. 2006. Vol.30. No.3. P. 428-471. DOI: [10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00018.x)
37. Sirajuddin S., Rosenzweig A.C. Enzymatic Oxidation of Methane // *Biochemistry*. 2015. 54(14): 2283-2294. DOI: [10.1021/acs.biochem.5b00198](https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00198)
38. Sullivan J.M., Trasher R.D., Edwards R.E. Recovery of phosphates from elemental phosphorus bearing wastes. Patent US No 5275639. 1994.
39. Tinberg C.E., Lippard S.J. Oxidation reactions performed by soluble methane monooxygenase hydroxylase intermediates H<sub>peroxo</sub> and Q proceed by distinct mechanisms // *Biochemistry*. 2010. Vol.49. No.36. P.7902-7912. DOI: 10.1021/bi1009375
40. Valentine J.S., Greenberg A., Foote C.S., Liebman J.F. Active Oxygen in Biochemistry // Springer. 1995. 463 p. DOI: [10.1007/978-94-011-0609-2](https://doi.org/10.1007/978-94-011-0609-2)
41. Waksman S.A. The Actinomycetes. Classification, Identification and Description of Genera and Species // Baltimore: The Williams and Wilkins Company. 1961. 2: 61-292.

42. White A.K., Metcalf W.W. Microbial Metabolism of Reduced Phosphorus Compounds // Annu. Rev. Microbiol. 2007. Vol.61. P.379-400. DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093357

43. Yamada H., Kumagai H. Synthesis of L-Tyrosine-Related Amino Acids by  $\beta$ -Tyrosinase // Advances in Applied Microbiology. 1975. Vol.19. P.249-288. DOI: [10.1016/s0065-2164\(08\)70431-3](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(08)70431-3)

## Characteristic of microbial strains resistant to white phosphorus

Anton Z. Mindubaev<sup>a\*</sup>, Keremli A. Saparmyradov, Yaw A. Akosah<sup>c</sup>, Edward V. Babynin<sup>c</sup>, Salima T. Minzanova<sup>b</sup>, Alexandra D. Voloshina<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Power Engineering and Advanced Technologies, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences

<sup>b</sup> Institute of Organic and Physical Chemistry named after A.E. Arbuzov. Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. Arbuzov St., 8. Kazan, 420088. Russia.

<sup>c</sup> Kazan (Volga Region) Federal University. University St., 18. Kazan, 420008. Russia.

E-mail: [mindubaev-az@yandex.ru](mailto:mindubaev-az@yandex.ru)

### Abstract

White phosphorus is one of the most dangerous environmental pollutants. In our works, cultures of microorganisms growing in media with a content of white phosphorus up to 1 % were obtained for the first time. These cultures are unique, and they demonstrate first ever example of the inclusion of white phosphorus in the biospheric circulation of the phosphorus element.

The morphological, partly biochemical and taxonomic descriptions of cultures of microorganisms that carry out the biodegradation of white phosphorus are performed. This work is important because a unique set of characters is a characteristic of the strain. The fact of the existence of a new strain of a microorganism is established only from the moment of its accurate description. As a result of the studies, the species affiliation of the studied microorganisms was established. It was confirmed by amplification of fragments of the 16S rRNA genes (in the case of streptomycetes prokaryotes) and 18S rRNA (in the case of fungi eukaryotes), carried out by the standard PCR method, using data from the international NCBI database. New strains of *Aspergillus niger* and *Streptomyces sampsonii* species have been identified. The research results show that the biodegradation of white phosphorus can be carried out by microorganisms from various taxonomic groups. Currently, the described strains are deposited in the All-Russian collection of microorganisms and may be subject to patenting.

**Key words:** white phosphorus, *Aspergillus niger* AM1, *Aspergillus niger* AM2, *Streptomyces sampsonii* A8, culture mediums, growth factors, morphological description, taxonomy.